

様式第4号ー1

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	佐藤 亮太
学 位 の 種 類	博士（理学）
学 位 記 番 号	甲 第1684号
学位授与の日付	令和2年3月25日
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当
学 位 論 文 題 目	Repurposing the psoriasis drug Oxarol to an ointment adjuvant for the influenza vaccine
主研究指導教員	福山 英啓 大学院客員准教授
論 文 審 査 委 員	(主査) 大野 博司 大学院客員教授 (副査) 秋山 泰身 大学院客員教授 (副査) 川崎 ナナ 教授 (副査) 古久保 哲朗 教授

論文内容の要旨

1800年頃にエドワード・ジェンナーによって開発された天然痘ワクチン以来、様々な感染症に対するワクチンが開発され、実用化されている。ワクチンは、医学分野でのイノベーションの歴史の中でも、最も有用なものの一つである。ワクチンは、一般的に、ターゲットとなる病原体特有の抗原と、非特異的に免疫システムを活性化させるアジュバントから構成される。最近まで、アジュバントの種類は、非常に限られており、80年近くもの長い間、アルミニウム塩アジュバントだけが唯一ヒトに使われてきた。新しいアジュバントが、2000年頃からようやく認可が下り、人に使われ始めている。これらは、MF59、及びAS03というサメの油に多く含まれるスクアレンをベースにしたものである。これらのアジュバントは、65歳以上の人に投与するインフルエンザワクチンに使われ、免疫記憶、抗体産生を増大させることが知られている。ただ、その免疫活性化メカニズムは謎のままである。このスクワレン・ベースのアジュバントの免疫記憶、抗体産生増大のメカニズムを明らかにすることで、ワクチンによる抗体産生に重要な役割を担う記憶B細胞の生成、維持に寄与する新たな機構を見つけ出すことを目的とし研究を始めた。

この研究において、2つの現象を見つけた。(1) 様々なアジュバントを用いて、マウスに免疫を行い、局所リンパ節を採取、RNA-seq法を用いて遺伝子発現プロファイリングの比較を行った。この時、スクアレン・ベースのアジュバントのみで、ステロイド経路の活性化が示唆された。この経路の下流には、コレステロールおよびビタミンD3の2つの合成経路が存在する。この遺伝子発現プロファイルの解析からすでに報告されているコレステロールによって活性化される遺伝子群の発現が見られなかったことから、ビタミンD3の合成経路活性化の可能性が示唆された。(2) スクワレン・ベースアジュバントの皮膚皮内免疫により、核内受容体であるビタミンD3受容体のターゲ

ット遺伝子である *Cyp24a1* 遺伝子の高い発現が見られた。この2つの現象から、本研究では、活性化ビタミンD3に着目し、ワクチンアジュバントとして機能するのかを検証し、その作用機序を明らかにした。

慢性の皮膚角化疾患である乾癬の治療薬としてすでに使用されている活性化ビタミンD3誘導体を主成分とするマキサカルシトール軟膏（オキサロール）を用いてそのワクチン効果を見た。市販のインフルエンザウイルス抗原を皮内に注射した部位上にオキサロールを塗布し、その後、インフルエンザウイルスを感染させた。対照群と比較し、活性化ビタミンD3誘導体をアジュバントとして使用した群で、感染による死亡が防がれた。また、この時、活性化ビタミンD3誘導体によるアジュバントにより、血清中の抗ウイルス抗原抗体の上昇が見られた。この時、抗原特異的な抗体産生には重要な役割を担う所属リンパ節等に存在する微細組織である胚中心について解析を行った。抗原特異的な濾胞B細胞や記憶B細胞、およびこれらのB細胞の活性化には必須の濾胞性T細胞の著しい増加が、活性化ビタミンD3誘導体アジュバント群で見られた。

次に、皮膚に塗布した活性化ビタミンD3誘導体が、どの細胞で受容され、この胚中心反応を誘導するのかを明らかにする目的で、皮膚の細胞を単離、それぞれの細胞種における活性化ビタミンD3受容体 (*Vdr*) の遺伝子発現を調べた。その結果、ケラチノサイト、皮膚上皮層に存在するランゲルハンス細胞、皮膚真皮層に存在するCD11c陽性樹状細胞で、*Vdr*の高い発現が確認された。そこで、これら3種類の細胞特異的に *Vdr* 遺伝子を欠損させたマウスを作製し、塗布アジュバントによる胚中心反応増強を担う細胞の同定を遺伝学的に調べた。その結果、ケラチノサイトでの *Vdr* 発現が必要であることがわかった。次に、ケラチノサイトの *Vdr* 依存的に誘導され、胚中心反応増強を担う標的遺伝子の同定を行った。すなわち、このケラチノサイト細胞特異的 *Vdr* 遺伝子欠損マウスを用いて、アジュバント投与後、RNA-seq法を用いて皮膚組織での遺伝子発現プロファイリングを行った。その結果、サイトカインである *Tslp* (Thymic stromal lymphopoietin) 遺伝子において、高い遺伝子発現誘導が見られ、*Vdr* 欠損でその遺伝子誘導が見られなくなった。このことから、TSLPの胚中心反応への関与が考えられた。このことを検証する目的で、精製TSLPタンパクを、ハプテン抗原と同時に免疫したところ、胚中心反応は増強した。また、逆に、アジュバントによる胚中心反応増強は、抗TSLP抗体の投与により、減少した。このことから、このアジュバントによる胚中心反応増強は、活性化ビタミンD3を受け取ったケラチノサイトでのVDRによって誘導されたTSLPが重要な役割を担っていることがわかった。さらに、ケラチノサイトで産生されたTSLPと胚中心反応とを繋ぐメカニズムを明らかにする目的で、TSLP受容体をコードする *Cr1f2* 遺伝子の細胞種特異的欠損マウスを作成した。この遺伝学的アプローチから、ランゲルハンス細胞ではない、CD11c陽性細胞が、TSLPを受け取り、その後、濾胞性ヘルパーT細胞を活性化し、胚中心反応を増強すると考えられた。以上の結果より、活性化ビタミンD3誘導体の塗布により、皮膚を透過し、ケラチノサイトのビタミンD3受容体を介して、TSLPが誘導され、皮膚に存在するTSLP受容体を発現するCD11c陽性細胞が授与し、活性化する。その後、おそらく、皮膚で活性化されたこれらの細胞は、所属リンパ節に移動、胚中心反応の増強が起こり、抗体産生細胞および記憶B細胞が増加、抗体が産生されると考えられる。これらの結果は、これまで知られていなかった皮膚での活性化ビタミンD3による、抗原特異的な抗体反応の増強に大きな役割を担っていることを明らかにした。

論文審査結果の要旨

佐藤亮太氏の論文審査では、専門分野、関連分野、及び外国語に関して4人の審査員で行った。

主査の大野は、免疫系におけるTSLPの作用機序について質問した。TSLPはサイトカインで、2型のヘルパーT細胞の増殖、本研究で示した濾胞性ヘルパーT細胞の増殖を促進すると回答。また、TSLPによって活性化された樹状細胞の遊走性を規定するケモカイン受容体の質問に関しても、CCR7などの分子を挙げ、的確に回答できていた。TSLP抗体で、活性化ビタミンD3による免疫応答増強効果はどの程度抑えられるのかという、TSLP経路以外の関与に関して質問をしたところ、抗原のみのコントロールと直接比較するデータは持っていないが、CD11c陽性細胞特異的TSLP受容体欠損マウスでの実験で、抗原特異的胚中心B細胞の増殖に関しては、抗原のみと同程度で止まっている結果を、補足として示した。また、濾胞性ヘルパーT細胞の増殖だけを見ると、他の因子の関与も否定はできないと回答した。TSLPによる細胞の活性化機構を尋ねると、STAT5のリン酸化が必要で、樹状細胞では、OX40Lの発現により、T細胞の活性化を促すという回答を得た。TSLP受容体の他の細胞、特に免疫細胞での発現に関して質問したが、ほとんどの免疫細胞で発現していることから、濾胞性ヘルパーT細胞などにも直接、効いている可能性は否定できないと回答。全般において、ほぼ的確に回答を得られた。

副査の秋山は、Alumの作用機序に関して説明したところ、ある報告では、細胞死による、尿酸、核酸を含む細胞内容物をNALP3やDAMP等が認識し、自然免疫細胞が活性化される機構があることを説明した。CD11c陰性細胞はどんな細胞かという質問に対して、抗原提示に必須のMHCIIの発現している細胞で、詳細な解析は行なっていないと回答。CD11c-CreマウスによるTSLP受容体の欠損効率を見ているが、一部、CD11c陰性細胞でも減っているように見えることを指摘した。これに対して、実際に減っていると答えた。いくら最終分化段階で、CD11c陰性細胞であっても、どこかの分化途中の段階でCD11c(*Itgax*遺伝子)が一旦発現したのもTSLP受容体を欠損させるので、正確には、CD11cの発現履歴のあるCD11c陰性細胞を見ていると考えていると回答した。

副査の古久保は、皮膚組織のRNA-seqによる解析で、発現誘導の割合が高いリスト以外の遺伝子の寄与はないのかという質問に対して、他の因子も考えていると回答した。TSLPが本当にケラチノサイト特異的に、発現しているのかを調べるのに、ケラチノサイト特異的*Tslp*欠損マウスは作らなかったのか？という質問に対して、現在手に入るもので実験を行った。免疫染色で、軟膏を連続塗布により誘導するアトピー性皮膚炎モデルのマウス、及び、実際のアトピー性皮膚炎の患者さんの皮膚の免疫染色で、ケラチノサイトで特異的にTSLPの高い発現が見られることから、このTSLPの発現は、ケラチノサイト特異的と考えている。TSLPにより、胚中心全体がおかしくなっているのではないかという質問に、ケラチノサイト特異的なもの、及び、他のCreラインでの活性化ビタミンD3による胚中心反応は、野生型と同じで、抗原特異的なものだけが少ないことを示していることから、抗原特異的

な胚中心反応に影響していると考えていると回答。中間発表で、ジフテリア毒素を用いた、細胞特異的除去を行った実験で、ランゲルハンス細胞を除去すると影響が見られていたように思うが、今回は、そのような結果は得られていない。それは何が違うのか？これに対し、少ない用量だと、ランゲルハンス細胞での影響も多少は見える傾向にあると回答。スクアレン機序に関して、何かわかったかという質問に関して、今のところわかっていないと回答した。

副査の川崎は、活性化ビタミンD3誘導体の軟膏で生まれる免疫増強は、本当にアジュバント効果なのか、と質問した。これに対し、活性化ビタミンD3誘導体を投与した部位の皮膚内皮に抗原を注射している。胚中心反応の増強に寄与する*Tslp*の発現のkineticsを調べており、ピークは12時間から24時間のところで、それ以降は、下がっていくことから、一過的に上がり、抗原を打つ時期と同時期、または少し前に打たなければこの効果はないと考えられると回答。また、用量依存性を調べたのかという質問に対し、用量依存性があることを答えた。注射では、効果はないのかという質問に対して、注射でも問題はないと答えた。また、活性化ビタミンD3は乾癬の抗炎症剤として承認されているが、本研究は逆の結果を示している。どのように接身できるのかという質問に対し、ビタミンD3は免疫系では、一般的に抑制の方向に働くが、皮膚のケラチノサイトから分泌されるTSLPが、胚中心反応を増強することから、本研究では後者を見ていると回答。TSLPでアレルギー疾患を誘発するのではという質問に対し、人で使われていて、毎日、一年を通して塗っている人がいるが、アレルギーに関しての報告は知らない。ただ、可能性は否定できない、と回答した。

関連分野に関する質問では、大野より、ジフテリア毒素を用いた細胞除去の作用機序について質問されたが、明確な答えは得られなかった。またワクチンの種類、投与経路、特に経口ワクチンについての作用機序について聞いた。弱毒化した生ワクチンやコンポーネントワクチンなどの部分的な回答を得た。ビタミンは何かという質問では、生体に必須の栄養素で、体内で合成できないもので、食物から取る必要がある。生体内の酵素の活性を補助する補酵素する分子という回答を得た。秋山は、統計学的な解析方法の使い分けを聞いた。曖昧な部分もあったが、概ね回答できていた。また、今回の研究で明らかになった一連のビタミンD3誘導体から始まる胚中心反応を増強する一連の活性化経路で、創薬としてターゲットになる分子は何かがあるか？という質問では、はっきりとした回答は得られなかった。川崎は、実際、インフルエンザの実験は、どのように行っているのか？感染実験に対する一般的な法的規制、生物材料の封じ込めレベルの違いについて質問した。より厳格な理解をすることを望む。古久保は、*Vdr*の転写活性化機構と抑制機構及び、転写反応そのものについての質問をした。転写と翻訳の説明に関して混同がみられ、クリアな回答を得られなかった。免疫分野での回答は、十分に答えられているが、それ以外の分野に関して、広く知識を、今後付けられることを望む。

外国語に関しては、英文作成、口頭での説明いずれも問題なく発表していた。スライドの英語のミススペルを2箇所指定され、その場で正しいスペルに書き直した。

以上の審査結果より、4名の審査委員全員一致で、学位授与に値すると評価した。